

## 論文の内容の要旨

氏名：上 道 一 輝

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文名：Epigenetic regulation of gingival epithelial cell death induced by short-chain fatty acids  
(短鎖脂肪酸誘導歯肉上皮細胞死へのエピジェネティクスの関与)

歯垢を構成する細菌は高濃度の酪酸やプロピオン酸などの短鎖脂肪酸を生成し、これらの作用により歯肉上皮細胞の細胞死が誘発される。その細胞死に伴い High Mobility Group Box 1 (HMGB1) をはじめとする Damage-associated molecular patterns (DAMPs) が細胞外へ放出される。DAMPs は炎症を引き起こす因子でもあることから、短鎖脂肪酸によって誘導される細胞死は歯肉炎をはじめとする歯周疾患の発症に関与する可能性がある。酪酸処理によって誘導される細胞死にはオートファジーおよび活性酸素種産生が必要であることが明らかにされているものの、短鎖脂肪酸が細胞死を誘導するメカニズムの全容は不明である。酪酸は強力な histone deacetylase (HDAC) 阻害剤であることが知られており、この作用によりヒストンアセチル化が亢進することで様々な遺伝子の発現が影響を受けていると考えられる。本研究では、短鎖脂肪酸の HDAC 阻害作用が、短鎖脂肪酸誘導歯肉上皮細胞死にどのように関与しているのかについて検討し、短鎖脂肪酸誘導細胞死のメカニズム解明を目的とした。

実験にはヒト歯肉癌由来培養細胞株 Ca9-22 細胞を用い、細胞の維持および前刺激には 10%牛胎児血清加 Minimum essential medium  $\alpha$  (10% FBS MEM $\alpha$ )を、細胞の刺激には 1% Rosewell Park Memorial Institute 1640 (10% FBS RPMI)を用いた。HDAC 阻害剤としては酪酸、プロピオン酸、バルプロ酸および suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)を用いた。また、ヒストンアセチル化酵素阻害剤として C646 を用いた。ヒストン H3 のアセチル化の変化は western blot 法により確認した。細胞膜破壊を伴う細胞死は、SYTOX-Green 色素を培養液に加え、二本鎖 DNA に取り込まれた色素から発する蛍光を測定することによって定量化した。さらに、同様の方法で処理した細胞を、Keyens BZ-X810 蛍光顕微鏡により観察した。酪酸処理による遺伝子発現の変化については、Ca9-22 細胞を C646 存在下あるいは非存在下で前培養した後、酪酸により処理し、total RNA を抽出した。ライブラリー作製後、Illumina 社製 Novaseq 次世代シーケンサーにより解析した。

一方、細胞形態や細胞間結合が生体に近く、生理的環境に近い歯肉培養系を作出するため、Ca9-22 細胞と初代ヒト歯肉線維芽細胞を用いた三次元培養系を確立した。三次元培養系の確認は、切片を作成し、抗 cytokeratin 抗体、抗 vimentin 抗体で免疫蛍光染色することにより行った。この培養系に酪酸を作用させ、培養上清中への細胞死に伴う DNA の放出および DAMPs の一種である Sin3A associated protein 130 (SAP130) の放出をそれぞれ SYTOX-Green dye および western blot 法により確認した。

これらの結果、酪酸に加え、プロピオン酸処理によってもヒストン H3 のアセチル化は亢進した。また、C646 の前処理により両短鎖脂肪酸処理によるアセチル化ヒストン H3 は著しく減少した。さらに、C646 による前処理は、酪酸およびプロピオン酸誘導ヒストンアセチル化および細胞死を抑制した。同様の結果が、バルプロ酸および SAHA による処理においても観察されたことから、細胞死には HDAC 阻害作用に伴うヒストンアセチル化の亢進が重要であると考えられた。

ヒストンのアセチル化はエピジェネティックな転写調節に関与する。そこで酪酸処理時にヒストン H3 のアセチル化亢進によって発現が上昇した遺伝子についてトランスクリプトーム解析により検索したところ、短鎖脂肪酸誘導細胞死に必要であるとされる活性酸素種やオートファジーに関連する多数の遺伝子が含まれていた。以上の事から、短鎖脂肪酸のもつ HDAC 阻害作用により誘導されたこれらの遺伝子の発現変化が細胞死を引き起こしている可能性が示唆された。

一方、三次元培養系の確立の有無を、免疫蛍光染色によって確認したところ、cytokeratin 陽性の上皮細胞は、vimentin 陽性線維芽細胞によって構成される固有層との間に明瞭な境界を形成し、相互の侵入は確認されなかった。この培養系に酪酸を作用させたところ、培養上清中に DNA や SAP130 の放出が確認された。

上記 2 つの研究から以下の結論を得た。

1. 歯垢中の細菌が産生する酪酸およびプロピオン酸は HDAC 阻害作用を有していた。

2. 酪酸によるヒストンアセチル化亢進により、オートファジーおよび活性酸素産生に関わる遺伝子発現が上昇した。
3. 2の結果、短鎖脂肪酸誘導細胞死に、ヒストンアセチル化により発現上昇した遺伝子が関与する可能性が示唆された。
4. 初代ヒト歯肉線維芽細胞とヒト歯肉上皮 Ca9-22 細胞からなる三次元培養系を構築した。
5. 三次元培養系においても、酪酸は歯肉上皮細胞の細胞死を引き起こした。

以上の結果は、短鎖脂肪酸によるエピジェネティックな遺伝子発現変化が、歯肉上皮細胞死の誘導に関与する可能性を示唆するものであり、短鎖脂肪酸誘導細胞死のメカニズム解明の一助になるものと考えられた。